Aus dem II. Anatomischen Institut
der Freien Universität Berlin
Direktor: Prof. Willy Schwarz

---

# Elektronenmikroskopische Untersuchungen über die Entstehung und Reifung des Corneastromas bei der Ratte

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der
medizinischen Doktorwürde
an den medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Heinz-Hubertus Hackelberg
aus Königsberg/Ostpreußen

1971

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547205_0059

Aus dem II. Anatomischen Institut
der Freien Universität Berlin
Direktor: Prof. Willy Schwarz

---

# Elektronenmikroskopische Untersuchungen über die Entstehung und Reifung des Corneastromas bei der Ratte

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der
medizinischen Doktorwürde
an den medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Heinz-Hubertus Hackelberg
aus Königsberg/Ostpreußen

Referent: Prof.H.J.Merker
Korreferent: Prof.H.Hager

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Gedruckt mit Genehmigung der
medizinischen Fachbereiche der
Freien Universität Berlin

Promoviert am: 27.4.1971

## Inhaltsverzeichnis


| | |
|---|---|
| Einleitung | 1 |
| Material und Methode | 11 |
| Befunde | 13 |
| Diskussion | 2o |
| Zusammenfassung | 28 |
| Literaturverzeichnis | |
| Lebenslauf | |

## Einleitung

Die Entwicklung des Auges stellt einen hochkomplexen Vorgang dar, bei dem Hirnanlage, Oberflächenektoderm und Kopfmesenchym sich gegenseitig beeinflussen. Zum Verständnis des Entstehungsmechanismus nur eines Teiles, z.B. der Cornea, ist deshalb die Kenntnis der Gesamtentwicklung notwendig.

In dem Teil der Neuralplatte, der später zum Dienzephalon wird, befindet sich beiderseits ein Gebiet, das im Stadium des Neuralrohrschlusses als Augenblase nach lateral bis an das Oberflächenektoderm vorwächst. Der Hohlraum dieser Augenanlage (Sehventrikel) stellt einen Teil des Hirnventrikelsystems dar und verschwindet erst, wenn sich ihr lateraler Teil einstülpt. Dabei entsteht der aus zwei Wandschichten bestehende Augenbecher, an dessen Rand beide ineinander übergehen: Augenbecherrand.
Aus der hinteren Wandschicht entsteht das Pigmentepithel, aus dem vorderen Blatt die Retina, deren Ganglienzellen durch ihre hirnwärts wachsenden Neuriten, dem späteren N. opticus, sich mit dem Gehirn verbinden.

In dem Bereich des Oberflächenektoderms, der der vorwachsenden Augenblase am nächsten liegt, kommt es durch Induktion zu einer Epithelverdickung: Linsenplakode. Diese vertieft sich zur Linsengrube und wächst, sich weiter einsenkend, in den Augenbecher hinein.

Aus dieser Linsengrube geht das Linsenbläschen hervor, das sich vom darüberliegenden Ektoderm abschnürt. In dem zwischen Linsenbläschen und Ektoderm entstandenen Raum entwickelt sich nun das stroma corneae.
(Starck, 1965; Clara, 1967; Glücksmann, 1929; Benninghoff/ Goerttler, 1964).

Die Entwicklung der Cornea

Da die Vertebratenaugen nur Unterschiede in der feineren Ausgestaltung von Sonderfunktionen aufweisen, sich aber im Bauprinzip nicht unterscheiden (Starck, 1965), stimmen auch die einzelnen Entwicklungsschritte und ihre Sequenz bei den verschiedenen Säugeraugen weitgehend überein.
Wegen der leichten Zugänglichkeit, einfachen Züchtungsbedingungen und anderer Vorteile ist bisher diese Entwicklung beim Hühnchen am besten aufgeklärt (Rohen, 1964). Deshalb soll hier die Entwicklung der Cornea zunächst am Beispiel des Hühnchens geschildert werden.

Der Augenbecher ist von Anfang an von einer Mesenchymverdichtung umgeben, die sich bald in eine innere Schicht lokkeren, gefäßreichen Bindegewebes (Chorioidea) und in eine äußere Lage straffen Bindegewebes (Sclera) differenziert. In Höhe des Augenbecherrandes geht später die Sclera mit scharfer Grenze in die Cornea über (Starck, 1965).

An den der Amnionhöhle zugewandten Stellen ist das Mesenchym der späteren Cornea mit epithelialem Ektoderm bedeckt. In den frühesten Stadien, d.h. unmittelbar nach Abschnürung der Linse aus dem darüberliegenden Ektoderm, reicht das Mesenchym nur bis zum Augenbecherrand und wandert erst später in den Raum zwischhen Linse und Ektoderm ein (Hay und Revel, 1969; Trelstad, 1968; Coulombre, 1964; O'Rahilly und Meyer, 1959; Coulombre und Coulombre, 1961).

Das zweischichtige präsumptive Corneaepithel unterscheidet sich vom übrigen epithelialen Ektoderm dieses Stadiums durch eine markante Vergrößerung der Basalzellen, was auf der Vermehrung sekretorisch tätiger Zellorganellen beruhen soll. Zwischen der Entwicklung dieser Zellorganellen und der Entstehung eines zellfreien faserigen sogenannten Primärstromas ("postepithelial layer") zwischen Linse und Ektoderm, wie es als lichtmikroskopisch homogene Membran schon von Kessler 1877 beschrieben wurde, besteht vielleicht ein zeitlicher Zusammenhang. Man nimmt daher an, daß es sich z.T. um ein Sekretionsprodukt des Corneaepithels handelt (Hay und Revel, 1969; Revel and Hay, 1965; Coulombre, 1964; O'Rahilly und Meyer, 1959).

Über die Entstehung des Primärstromas liegen allerdings noch widersprüchliche Meinungen vor. Jedoch wird seine Existenz schon vor der Mesenchymzelleinwanderung beim Hühnchen und bei einigen Säugern von vielen Autoren bestätigt (Kessler 1877, Ladijensky 1915, Levi 1926, Laguesse 1926, zitiert bei Lauber, 1936; Coulombre, 1961, 1964; O'Rahilly und Meyer, 1959; Trelstad, 1968; Hay und Revel, 1969).

Die Fibrillen dieses Primärstromas sollen von Anfang an in jeder Hinsicht den reifen Corneafibrillen gleichen (Querstreifung, Durchmesser, Verhalten gegenüber Kollagenase) und in großer Zahl auftreten.
Nach Neifach (1952, zit. in Lopashov und Stroeva, 1961) können Corneafibrillen jedoch nur in Gegenwart von Mesenchymzellen entstehen, Grund- und Kittsubstanzen aber auch von Epithelien sezerniert werden. Die typische Periodizität (Karmazsin, 1962) und das für Kollagen typische Hydroxyprolin (Herrmann, 1958) konnten erst vom 8. Tag an nachgewiesen werden, also nach der Einwanderung von Mesenchymzellen.

Von Anfang an sollen sich die Fibrillen bereits in Lamellenform anordnen (Kessler 1877, Ladijensky 1915, Levi 1926, Laguesse 1926, zit. in Lauber, 1936; Coulombre, 1964; Trelstad, 1968, O'Rahilly und Meyer, 1959; Hay und Revel, 1969). Diese Anordnung prägt dann auch das für die erwachsene Cornea so charakteristische Bild der Schichtung in Lamellen.
Die Primärstromalamellen bestehen aus ein bis zwei parallelen Fibrillenschichten und überkreuzen sich annähernd rechtwinklig, wobei alle Lamellen weitgehend oberflächenparallel verlaufen sollen (selektiv uniplanar). Am Ende des Tages 3 (Stromadicke 2 - 3 mü) kann man etwa sechs, nach vier Tagen (Stromadicke 5 - 7 mü) etwa 15 und nach fünf Tagen (Stromadicke 1o - 12 mü) etwa 2o Lamellen zählen (Ladijensky, 1915).
In diesem Ordnungssystem bestehen noch viele Unregelmäßigkeiten. Die Fibrillen haben oft einen geschlängelten Verlauf, und die Lamellen sind nicht genau oberflächenparallel, weshalb auch eine genaue Zählung nur schwer möglich ist. Von einem "quasi-regulären Gitter" wie in der adulten Cornea (Schwarz und Keyserlingk, 1966, 1969 a, 1969 b) kann daher

also noch keine Rede sein.Abgesehen von Dicke und Zahl der Lamellen ändert sich das Stroma dann bis zur Mesenchymzellinvasion beim Hühnchen nicht mehr.

Vom Tag 4 an,beginnen sich die Mesenchymzellen des präsumptiven Corneaendothels abzuflachen,und vom Augenbecherrand, in Richtung auf das Corneazentrum zu wandern,wo ihre Wanderung durch Kontaktinhibition beendet wird (Trelstad et al., 1967).Wenn sie ihre endgültige Lage an der rückwärtigen Oberfläche des Primärstromas erreicht haben,entwickeln sie sich zu einem einschichtigen polygonalen Endothel,das die vordere Augenkammer von vorne begrenzt (Rohen,1964) .

Später sezernieren die Endothelzellen ihre Basalmembran, die Descemet'sche Membran,die das Endothel vom Stroma trennt. Sie ist lichtmikroskopisch homogen und außerordentlcich widerstandsfähig .Elektronenmikroskopisch erkennt man eine fibrillär-lamelläre Struktur von großer Regelmäßigkeit (Jakus,1956).

Zu Beginn der Endotheleinwanderung ist das Stroma 5 - 7 mü dick.Wenn das Endothel kontinuierlich und fest geschlossen ist,kommt es unmittelbar vor der Einwanderung des zweiten Mesenchymschubes,nach einer Inkubationszeit von 5 Tagen,zu einer plötzlichen Schwellung von 1o mü Dicke auf 3o - 5o mü (Kessler,1877;Ladijensky,1915;Hay und Revel,1969;Coulombre, 1964).Gleichzeitig erscheinen jetzt die mesenchymalen Prä - fibroblasten am Augenbecherrand.

Möglicherweise stellt die erwähnte plötzliche Schwellung den Auslösemechanismus für die Mesenchymzellinvasion dar.Maurice (1957,1962,1968) vermutet die Ursache der Schwellung in dem Einfluß des neugebildeten Endothels auf den Wasser- und Ionentransport aus dem Stroma,der nun durch die kontinuierliche Endothelbegrenzung einem aktiven,Sauerstoff verbrau - chenden Pumpmechanismus unterworfen ist (Green,1968;Langham,1968).

Die Einwanderung des sog.sekundären Mesenchyms (Lopashov und Stroeva,1961) geschieht innerhalb eines halben Tages,sodaß nach 7 Tagen das Stroma vollgepackt ist mit zu Fibroblasten sich differenzierenden Mesenchymzellen.Sie dringen zwischen

den präexistenten Lamellen ,diese als Leitstrukturen benutzend, vor (Kessler,1877;Ladijensky,1915;Levi,1926;Laguesse,1926; Trelstad,1968;O'Rahilly und Meyer,1959;Coulombre,1964;Hay und Revel,1969).Nach 7 Tagen kann man bei einer Stromadicke von 14o mü 12 - 15 Fibroblastenschichten zählen,nach 9 Tagen (Stromadicke 22o mü) ca 25 Fibroblastenschichten (Hay und Revel,1969).

Unter dem Corneaepithel lassen die Fibroblasten nur einen ganz schmalen Raum frei,der sich später zur Bowman'schen Membran entwickelt und einen unveränderten Rest des Primär - stromas darstellt.

Nach 14 Tagen Inkubation ist die Cornea des Hühnchenembryos noch opak,die Lichtdurchlässigkeit beträgt nur ca. 4o %.Nach 19 Tagen Inkubation ist die Cornea transparent,die Licht - durchlässigkeit beträgt 96 % (Coulombre und Coulombre,1961). Die wesentlichsten Veränderungen,die sich in der Zwischenzeit abspielen sind eine von hinten nach vorn fortschreitende starke Entwässerung,Zunahme der Metachromasie,dichtere Pak - kung und regelmäßigere Anordnung der Fibrillen,Abflachung der Fibroblasten und Abnahme der Stromadicke (Coulombre und Coulombre,1961).Der Mechanismus dieser Vorgänge ist noch nicht ausreichend geklärt.Coulombre und Coulombre (1959a) machen darauf aufmerksam,daß der Beginn dieses Prozesses zusammem - fällt mit dem Beginn der durch die Hypophyse aktivierten Schilddrüsentätigkeit und,daß die Zufuhr von L-Thyroxin diese Vorgänge beschleunigt,Zufuhr von Thiouracil dagegen sie verzögert (Coulombre und Coulombre,1964a) Hay und Revel (1969) erklären das weniger mit qualitativen oder quantitativen Veränderungen des Mukopolysacharidgehaltes,als eher mit Veränderungen im Wasser- und Ionentransport,die zu einer Dehydratation führen.

Am Tag 19 sind die adulten Verhältnisse erreicht: Zwischen zwei Lagen abgeflachter Fibroblasten liegen jetzt immer drei oder mehr rechtwinklig sich kreuzende,oberflächenparallele Fibrillenlamellen.Die Zahl der Fibroblastenschichten soll mit ca.25 in etwa der Zahl von Kollagenfibrillenlamellen des Primärstromas entsprechen (Trelstad,1968;Coulombre,1964; O'Rahilly und Meyer,1959;vgl.auch Schwarz,1953 a,b,1961). Die Primärstromalamellen sind allerdings nur 1 - 2 Fibrillen

dick,die endgültigen dagegen sind mehrschichtig und aus mehreren,ca.6 Fibrillen dicken,Schichten zusammengesetzt,welche sich mit ihren Nachbarn rechtwinklig kreuzen.

Entsprechende eingehende Untersuchungen bei anderen Tierarten,besonders bei den häufig verwendeten Laboratoriumstieren liegen dagegen bisher leider noch nicht vor.Bei solchen Untersuchungen,besonders bei einer elektronenmikroskopischen Bearbeitung der Corneaentwicklung bei anderen Tieren,sollte vor allem das Stroma berücksichtigt werden.

Die bindegewebige Interzellularsubstanz beträgt nicht nur 7o - 9o % des Trockengewichtes (Payrau,1968),sondern diese Substanz ist auch für die beiden wichtigsten Eigenschaften der reifen Cornea verantwortlich: Festigkeit und Transparenz (Smelser und Ozanics,1965;Schwarz,1953 a,b).

Nach den bisher beschriebenen Befunden und nach analogen Vorgängen in anderen Bindegewebsformationen kann die Bildung des Corneastromas in folgende Abschnitte eingeteilt werden:

1. Entstehung des primären Stromas
2. Besiedelung mit Mesenchymzellen
3. Bildung des Kollagens und der Glycosaminoglycane (GAG),gleich Fibrillogenese
4. Bündelung der Fibrillen zu Fasern und Ausprägung der Textur

Über die ersten beiden Punkte existieren unseres Wissens noch keine genügenden Kenntnisse bei den uns interessierenden Tieren,z.B.der Ratte.Die Vorstellungen über diese Vorgänge beruhen auf vergleichenden Untersuchungen und lichtmikroskopischen Kontrollen an anderen Tierarten (siehe oben).

Gute Kenntnisse konnten dagegen über die Morphologie der Fibrillogenese im Binde- und Stützgewebe allgemein erarbeitet werden,die im folgenden besprochen werden sollen (Wassermann,1956;Schwarz und Merker,196o;Schwarz,1961,1964; Schwarz et al.1962;Merker,1961,1971,1971 a;Merker et al. 196o;Dziewiatkowsky,1962;Rohr,1965;Ross und Benditt,1965; Revel und Hay,1963;Matthews,197o;Serafini-Fracassini et al. 197o;O'Connell und Low,197o;Wise und Flickinger,197o).

Außerordentlich wichtig gerade für die Transparenz und Festigkeit der Cornea ist die bei diesen Untersuchungen längst noch nicht genügend berücksichtigte Ausprägung der Textur.

Fibrillogenese

In den letzten Jahren konnte Einigkeit darüber erzielt werden, daß die Kollagensynthese, d.h. die Synthese des Tropokollagenmoleküls (TC) als dem grundlegenden Baustein der Bindegewebsfasern, in den Fibroblasten stattfindet (Lit. bei Waasermann, 1956; Schwarz und Merker, 1960; Schwarz, 1961, 1964; Merker, 1971).

Ebenso geht die Synthese des zweiten Hauptbestandteiles der Bindegewebsintercellularsubstanz, der Mukopolysaccharide (MPS) oder der Glycosaminoglycane (GAG) in den Fibroblasten selbst vor sich (Schwarz, 1961, 1964; Rohr, 1965, Dziewiatkowsky, 1962).

Das Kollagen besteht aus Polypeptidketten mit typischer Aminosäuresequenz, die durch einen besonderen Reichtum an Hydroxyprolin ausgezeichnet ist. Durch das hohe elektronenmikroskopische Auflösungsvermögen ( 10-20 Å ) konnten die letzten Syntheseschritte des TC-Moleküls (15 Å zu 2800 Å ) der morphologischen Untersuchung zugänglich gemacht werden.

In allen eiweißsezernierenden Zellen findet man ein sehr stark ausgebildetes rauhes, d.h. massenhaft mit Ribosomen und Polysomen besetztes endoplasmatisches Retikulum (ER). An diesen den Membranen aufsitzenden Ribosomen werden die Polypeptidketten synthetisiert (O'Connell und Low, 1970; Merker, 1961, 1971; Schwarz et al., 1962; Revel und Hay, 1963).

Wie das Syntheseprodukt von den Ribosomen in das Hohlraumsystem des ER gelangt ist noch nicht klar (Rohr, 1965; Merker, 1971). Jedenfalls kann man bei stärkster Vergrößerung 15 Å dicke Filamente im ER erkennen, bei denen es sich höchstwahrscheinlich um monomere TC-Moleküle handelt, die aus drei in $\alpha$- Helixform in einander verschlungenen Polypeptidketten bestehen (Schwarz und Merker, 1960). Die Zusammenlagerung der drei Ketten geschieht also z.T. schon im ER des Fibroblasten. Zur gleichen Zeit und am gleichen Ort soll auch die Hydroxy-

lierung von Prolin zu Hydroxyprolin vor sich gehen (Ross und Benditt,1965).

Die Sekretion des TC in den Extrazellulärraum (EZR) könnte auf zwei Wegen ablaufen:
1. Durch direkte Öffnung des ER in den EZR (Schwarz,1964; Schwarz et al.,1962) und
2. durch eine Passage von ER-inhalt zum Golgiapparat via Vesikelfluß (Schwarz,1964;Schwarz et al.,1962;Merker,1961, 1971;Revel und Hay,1963).Über diesen letzteren Weg wird wahrscheinlich in vielen Zellen der größte Teil der Syn - theseprodukte transportiert (Hay und Revel,1969).

Gleichzeitig mit der TC-synthese läuft die Synthese der MPS-proteinkomplexe (Glycosaminoglycane = GAG) ab.Die ersten Syntheseschritte des GAG finden in den Mikrosomen und im Hyaloplasma statt (Merker et al.,1960),die spätere Sulfurierung im Golgiapparat (Dziewiatkowsky,1962).Der Proteinanteil wird ebenfalls am rauhen ER synthetisiert,in den Golgikomplex transportiert und dort mit den MPS vereinigt.Daraus erklärt sich,warum die Fibroblasten sowohl ein gut ausgebildetes rauhes ER als auch einen stark entwickelten Golgikomplex erkennen lassen (Schwarz,1964;Rohr,1965;Merker,1961,1971).

Der nächste Schritt bei der Reifung der Intercellularsubstanz nach der Sekretion ist die sogenannte "marginal condensation": Kollagen und GAG liegen als dichte,ungeordnete Massen am äußeren Fibroblastenrand.Die TC-moleküle sind noch nicht ge - streckt und haben noch keinen geordneten Kontakt untereinander und mit den GAG.

Der folgende Schritt ist die sogenannte "Nucleation" :
Unter dem Einfluß sulfurierter GAG-moleküle beginnen sich die TC-moleküle zu strecken und sich an die GAG-Matrizen anzulagern,wo sich nun weiteres Tropokollagen,jeweils um 1/4 der Länge versetzt,anlagert ( = Aggregation) (O'Connell und Low, 1970;Serafini-Fracassini et al.,1970;Merker,1971,1971 a ).

Wenn sich genügend TC zusammengelagert hat,sodaß eine Dicke von 150 Å erreicht ist,dann wird die Querstreifung sichtbar.

Die Ursache dafür kann einmal quantitativer Art sein, d.h. es ist eine bestimmte Anzahl reaktiver Gruppen notwendig, damit die Querstreifung erkennbar wird, oder die Ursache liegt in einer unterschiedlichen Anordnung der Moleküle unterhalb einer Dicke von 150 A, wie es z.B. Dische (1964) für die Basalmembran annimmt.

Normalerweise geht die Entwicklung folgendermaßen weiter: Durch fortgesetzte Aggregation von Kollagenbausteinen werden die Fibrillen dicker bis sie einen für Art und Organ charakteristischen Wert erreichen. Die dünnsten Fibrillen findet man in der Cornea (Schwarz, 1953 a, 1953 b). Bei der Regulierung des Dickenwachstums spielen die Glycosaminoglycane vermutlich eine wesentliche Rolle, denn Bindegewebe mit einem hohen Gehalt an bestimmten stark polymerisierten GAG enthalten dünne Fibrillen und umgekehrt (Payrau, 1968), eine Tatsache, die eng mit der Corneatransparenz zusammenhängt (Schwarz, 1953 a, 1953 b; Schwarz und Keyserlingk, 1966, 1969 a, 1969 b).

Durch Einführung der Rutheniumfärbung in die Elektronenmikroskopie ist es gelungen, auch die GAG-polymeren morphologisch nachzuweisen. Im EZR erkennt man sie als 300 - 600 A dicke Klumpen, von denen meist meist mehrere 30 - 60 A dikke Fäden in die Umgebung ausstrahlen. Bei diesen Klumpen soll es sich um dichte Fadenknäuel handeln, deren Anfang und Ende manchmal als die erwähnten 30 - 60 A dicken Fäden zu erkennen sind. Sie kommen in zwei Formen vor:
Einmal sind sie wahllos im EZR verstreut, zum Anderen sind sie mit den dünnen Fäden in regelmäßigen Abständen an die Fibrillenoberfläche angelagert. Diese Befunde unterstützen die Vorstellungen über die Wichtigkeit der Glycosaminoglycane bei der Regulierung der TC-Aggregation (Serafini-Fracassini et al., 1970; Matthews, 1970).

Wie die Fibrillendicke, so ist auch die Faserdicke (Fibrillenanzahl pro Faser) und die besondere Textur neben funktionellen, im wesentlichen von genetischen Faktoren abhängig. Die GAG-Schablonen, die schon bei der TC-Polymerisation eine wesentliche Rolle spielten, sollen auch die endgültige Texturbildung beeinflussen, indem sie sich allmählich ordnen. Daran können sich die Zellmembranen orientieren und anpas-

und so ebenfalls eine richtende Wirkung ausüben.Dadurch schaffen sie mit die Voraussetzungen für die Anordnung der Fibrillen entsprechend ihrer endgültigen Textur (Schwarz und Merker,1960).Diese Vorstellungen wurden mit den älteren elektronenmikroskopischen Untersuchungsverfahren (Versilbe - rung ,Kontrastierung mit Uranylacetat und Bleicitrat) gewonnen und noch nicht mit Hilfe der Rutheniummethode nachgeprüft.

Elektronenmikroskopische Untersuchungen über die Genese der Feinstruktur des stroma corneae und diese Probleme liegen bisher,wie oben bereits berichtet,nur für das Hühnchen und vom Menschen vor (Schwarz,1953 b;Schwarz und Merker,1960) *vor*.
Für die am meisten gebrauchten Laboratoriumstiere wie Ratte, Maus,Kaninchen konnten entsprechende ausführliche Angaben in der Literatur nicht gefunden werden.Da die Kenntnis dieser Vorgänge für das Verständnis von Mißbildungsentstehung im Augen- und Hirnbereich wichtig ist,wurde die Rattencornea während der intrauterinen Entwicklung untersucht.
Dabei wurden folgende,auch bei der Hühnchenentwicklung noch umstrittene Probleme berücksichtigt:
1. Existenz und Ordnung des Primärstromas, 2. Besiedelung des Primärstromas mit Mesenchymzellen sowie Fibrillogenese, 3. Übergang von der Regellosigkeit der Fibrillenanordnung in diesem Raum zwischen Linsenbläschen und epithelialem Oberflächenektoderm zur Ordnung b.z.w. der Übergang von den älteren Ordnungssystemen zur endgültigen Ordnung.

## Material und Methode

Als Untersuchungsmaterial wurde ein Ratten Wistar-Stamm(Paderborn,FW 69) verwendet.Die Schwangerschaftsdauer konnte genau bestimmt werden: Nach Adaptation der Tiere an einen veränderten Tag-Nacht-Rhythmus wurden weibliche Tiere im Östrus vormittags zwischen $7^{30}$ und $9^{30}$ mit Böcken verpaart.Da bereits um 8 Uhr 8o % der weiblichen Tiere spermienpositiv waren,setzten wir diesen Zeitpunkt als Stunde O,d.h.als Schwangerschaftsbeginn fest.Die folgenden 24 Stunden entsprechen damit dem Tag O.Die Stundenzahlen werden auf 8 Uhr bezogen und können dadurch ebenfalls berücksichtigt werden.

In dieser Arbeit wurden Rattenembryonen vom Tag 11 bis zur Geburt (Tag 21) verwendet.

Nach Dekapitation des Muttertieres und Schnittentbindung erfolgte sofortige Fixierung des Keimes in toto.Danach präparierten wir ,noch in der Fixierungslösung,den Kopfabschnitt mit der Cornea.

Bei der Fixierungslösung handelte es sich um ein modifiziertes Karnovsky-Gemisch folgender Zusammensetzung:
3% Glutaraldehyd,3 % Paraformaldehyd in o,1 m Cacodylatpuffer (pH 7,2).

Nach einer Fixierungsdauer von drei Stunden und Waschen des Präparates in der Pufferlösung schloß sich die Nachfixierung in 1%-igem gepuffertem (o,1 m Cacodylatpuffer,ph 7,2) Osmiumtetroxyd für eine Stunde an.

Nach stufenweiser Entwässerung in der Acetonreihe erfolgte die Einbettung in Mikropal (Firma Ferak,Berlin).

Die Schnitte wurden mit dem LKB-Ultrotom und dem Reichert-Mikrotomen hergestellt.

Zur Kontrastierung benutzten wir Uranylacetat und Bleizitrat.

Ein Teil der zur elektronenmikroskopischen Untersuchung bestimmten Präparate wurde mit der Ruthenium-Methode nach Myers et al.(1969) zusätzlich behandelt (1,4 % Glutaraldehyd in o,1 m Cacodylatpuffer mit 15oo ppm Rutheniumrot für zwei Stunden fixiert,Waschen in Cacodylatpuffer mit 8oo ppm Rutheniumrot und Nachfixierung in 2 % iger Osmiumtetroxydlösung mit 4oo ppm Rutheniumrot).

Die Aufnahmen wurden an Siemens Elmiskopen vom Typ I und I a hergestellt bei einer Primärvergrößerung von 1ooo - 4o ooo

und einer Strahlspannung von 8o Kv.
Die Auswertung erfolgte an dreieinhalbfachen Papiervergrößerungen.

Zur Lokalisation und Kontrolle der Schnittebene wurden vor Anfertigung der Dünnschnitte sogenannte Semidickschnitte hergestellt, die nach Färbung mit alkalischer wässriger Giemsalösung bei 60° C lichtmikroskopisch gut zu beurteilen sind.

## Befunde

### Lichtmikroskopie

Der Augenfortsatz der Hirnanlage nähert sich bei Rattenembryonen am Ende des Tages 11 oder zu Beginn des Tages 12 dem entsprechenden Oberflächenektoderm der lateralen Kopfseite.
Im Verlaufe des Tages 12 bildet sich die Linsenplakode und senkt sich zur Linsengrube ein.Während sich um diese Einsenkung der typische Augenbecher bildet,schnürt sich zu Beginn des Tages 13 das Linsenbläschen vom Ektoderm ab.
Gegen Ende des Tages 13 konsolidieren sich an der Abschnürungsstelle die Grenzen des wiedervereinigten Oberflächenektoderms.
Am frühen Tag 14 beginnt die Entwicklung des stroma corneae durch Einwanderung von Mesenchymzellen.Die Besiedelung des Raumes zwischen Ektoderm und Linsenbläschen geschieht vom Augenbecherrand her,der durch die gut ausgebildeten Limbusgefäße charakterisiert ist.

Die einwandernden Mesenchymzellen sind zunächst plump und rundlich,flachen sich aber bald ab und ordnen sich oberflächenparallel an.Gleichzeitig kommt es zu einer Schichtenanordnung der eingewanderten Mesenchymzellen.Am Tag 16 lassen sich dann bereits 2 - 3 Schichten und bei der Geburt bis zu 1o Schichten nachweisen.

Mit den üblichen Färbemethoden kann im Lichtmikroskop erst relativ spät der Nachweis fibrillärer Bindegewebsstrukturen erbracht werden.Die ersten sicheren Fibrillen kommen am Tag 16 zur Beobachtung.

Die Darstellung von Mukopolysachariden gelingt dagegen etwas früher (am frühen Tag 16).Sie stellen sich häufig angedeutet schon dar,sobald der Spalt zwischen Linsenbläschen und Ektoderm lichtmikroskopisch zu erfassen ist(Tag 14/15).

Die typische Packung des Corneastromas prägt sich bei der Ratte erst relativ spät aus.Bei günstiger Schnittrichtung, meistens parallel zur Oberfläche,läßt sie sich am Tag 17

zum erstenmal erkennen.

Im polarisationsoptischen Bild dagegen stellt sich die Textur der Fibrillenbündel deutlicher dar.

Elektronenmikroskopische Befunde

Die elektronenmikroskopische Beschreibung soll hier zu dem Zeitpunkt beginnen, an dem die Verbindung zwischen Linsenbläschen und Ektoderm abreißt. Im zentralen Bereich, d.h. an der Stelle der ursprünglichen Verbindung sind die Grenzen der Epithelzellen zum Mesenchym hin noch sehr unregelmäßig und hier fehlt zunächst auch noch die Basalmembran, sowohl um das Linsenbläschen als auch unter dem Epithel.

Während die Grenzen sich glätten und eine Basalmembran neugebildet wird, erweitert sich der Raum zwischen Linsenbläschen und Ektoderm. Dieser Raum ist am frühen Tag 14 ca. 15 mü breit und erscheint bei Darstellung mit den üblichen elektronenmikroskopischen Präparationstechniken, wie Kontrastierung mit Uranylazetat, Bleizitrat oder bei Versilberung optisch leer. Bei Darstellung mit der Rutheniummethode kann man jedoch feine z.T. aufgeknäulte, z.T. gestreckte Filamente erkennen, die im typischen Falle folgende Struktur erkennen lassen: Zentral sind sie zu einem 300-1000 Å großen dichten Knäuel verdreht, von dem aus einige feine 20-30 Å dicke Filamente unterschiedlich weit in die Umgebung ausstrahlen. Die ausstrahlenden feinen Filamente benachbarter Knäuel berühren und verflechten sich. Es entsteht so ein Netzwerk aus diesen Strukturen, die wegen ihrer Ähnlichkeiten mit entsprechenden Strukturen in anderen Bindegewebsformationen als GAG-Makromoleküle anzusprechen sind.

Nur ganz vereinzelt lassen sich zu diesem Zeitpunkt, d.h. vor der Besiedelung dieses Raumes mit Mesenchymzellen feine Filamente von 50 - 120 A Durchmesser darstellen, die stellenweise von den oben beschriebenen dünneren Filamenten berührt werden. Häufig findet sich auf der Oberfläche dieser dickeren (bis 120 Å) Filamente ein feingranuläres und filamentäres Material, das die Konturen verwischt oder maskiert.

In Analogie zu Befunden in anderen Bindegewebsformen kann man annehmen, daß es sich um Vorformen

kollagener Fibrillen handelt (vgl.Fibrillogenese).Beide Filamentarten (GAG und Kollagenvorstufen) liegen noch ohne erkennbare Ordnung und ohne geordneten Kontakt zueinander im zellfreien Raum zwischen Linsenbläschen und Ektoderm.

Die weitere Entwicklung wird durch die vom Tag 14 an einwandernden Mesenchymzellen geprägt.Diese Zellen zeichnen sich im elektronenmikroskopischen Bild zunächst durch eine polygonale Gestalt mit mehreren plumpen Zellfortsätzen aus, die entgegen lichtmikroskopischen Befunden,in der Regel nicht untereinander in Kontakt stehen.Dieser Eindruck dürfte auf der durch die Schnittdicke bedingten Überlagerung von Zellfortsätzen in verschiedenen Ebenen zurückzuführen sein.

Der große, meist rundliche Kern liegt in der Mitte und enthält in seinem aufgelockerten Karyoplasma einen häufig wandständigen Nucleolus.

Das Cytoplasma ist durch das Vorherrschen freier,etwa 175 Å großer, Ribosomen gekennzeichnet.Diese Partikel sind nicht wahllos,sondern in Gruppen,Ketten oder Rosettenform als Polysomen angeordnet.Die Zahl der Mitochondrien ist nicht sehr groß,sie enthalten nur wenig Matrix und eine geringe Anzahl cristae.Zahl und Größe der membranumgrenzten Hohlraumsysteme des endoplasmatischen Retikulums sind gering.Vereinzelt kommen Filamente vor,oft in der Nähe der Zelloberfläche und in den Zellfortsätzen.Ebenso finden sich nur wenige kleine Granula,Vesikel und Vakuolen.Zellteilungen sind häufig.

Dieses Bild der Mesenchymzellen ändert sich nicht wesentlich bis sie sich im Corneazentrum treffen.Zu diesem Zeitpunkt findet man zwischen beiden epithelialen Verbänden nur ein oder zwei Mesenchymzellschichten.

Sehr bald ändern sich jetzt das elektronenmikroskopische Bild und die Form der Mesenchymzellen des Corneastromas.Sie verlieren ihre runde Form,werden abgeplattet und ausgeprägt bipolar,wobei ihr Längsdurchmesser beträchtliche Werte erreicht.Ihr Querdurchmesser dagegen wird sehr klein.Obwohl die geringe Schnittdicke elektronenmikroskopischer Präparate (500 Å) exakte Längenangaben kaum erlaubt,ergaben mes -

sungen zu diesem Zeitpunkt Längenwerte von 5o - 1oo mü und eine Breite (im Bereich des Kernes) von nur 5 mü.

Trotz dieser markanten Formveränderungen,die bei sich differenzierenden Fibroblasten an anderen Stellen des embryonalen Organismus nicht angetroffen werden,entwickeln diese Zellen die typischen morphologischen Zeichen einer ausgeprägtenProtein-Synthese- und Sekretionsaktivität.In rasch zunehmender Zahl und Größe bilden sich die oft zu Zisternen erweiterten Hohlraumsysteme des ER mit massivem Ribosomenbesatz (rauhes ER). Gleichzeitig vergrößert sich der vorwiegend aus Vesikeln,Vakuolen,Granula und, im Vergleich zum ER,kurzen parallel gepackten Hohlraumsystemen bestehende Golgiapparat,dessen Membranen frei von Ribosomenbesatz sind.Die Zahl der freien Ribosomen verringert sich zugunsten der membrangebundenen,die jetzt deutlich überwiegen.Im Laufe der weiteren Embryonalentwicklung ändert sich die Morphologie dieser flachen Fibroblasten des stroma corneae nicht mehr wesentlich.

In der Folge kommt es weiter zu einer Zellvermehrung,aus der zusätzliche Fibroblastenschichten hervorgehen.Zur Zeit der Geburt sind bis zu 1o Fibroblastenschichten b.z.w. Etagen gebildet.

Am Anfang dieser Entwicklung,d.h.kurz nach dem Beginn der Mesenchymzelleinwanderung ,läuft die Ausbildung des Corneaendothels ab.Es kommt dadurch zur Abgrenzung der vorderen Augenkammer vom Corneastroma.Auf diese Vorgänge,sowie auf die Bildung der Descemet'schen Membran,die erst zum Geburtstermin in vollem Gange ist,soll an dieser Stelle nicht eingegangen werden.

Während der Abflachung der Corneafibroblasten,der Ausbildung charakteristischer cytoplasmatischer Fibroblastenemerkmale und Vermehrung der Fibroblastenetagen treten im intercellulären Raum des Corneastromas in zunehmendem Maße elektronenoptisch faßbare Strukturen auf.Zunächst nimmt die Zahl der weiter oben beschriebenen dünnen filamentären Kollagenvorstufen zu.Eine bestimmte Ordnung,eine Vorzugsrichtung der Fibrillenorientierung oder eine Bündelung in bestimmten, größeren Zügen ist dabei noch nicht zu beobachten.

In der nächsten Phase (Tag 15) treten etwa 15o -2oo Å dicke Fibrillen auf,die bereits eine Querstreifung erkennen las - sen.In den vorliegenden Bildern konnte man solche Strukturen vom Tage 15 an nachweisen.Es handelt sich dabei aber noch nicht um die charakteristische und vollausgeprägte Querstreifung,wie wir sie bei den reifen Corneafibrillen antreffen.Bei hoher Vergrößerung stellt sich meist eine sogenannte konti - nuierliche Querstreifung dar,bei der die regelmäßig wiederkehrende Periodenlänge etwa 21o Å beträgt.

Die weitere Entwicklung verläuft dann sehr rasch.Die Zahl der Fibrillen vermehrt sich in den nächsten 24 Stunden beträchtlich,und einzelne Fibrillen erreichen bald die endgültige durchschnittliche Dicke um 275 Å und zeigen die typische Querstreifung von 64o Å ohne jedoch die hohe Unterteilung der Sehnenfibrillen zu erreichen,die sich auch bei den adulten Corneafibrillen nur sehr schwer und selten einmal darstellen läßt.Bei hoher Auflösung gelingt es meistens nur 4-5 dunkle und eine entsprechende Anzahl heller bands b.z.w. interbands, pro Periode darzustellen.

Nach dieser Anfangsphase der Fibrillogenese,die mit der Ausbildung typischer Corneafibrillen einhergeht,laufen zwei Vorgänge ab,die für die Morphologie der fertigen Cornea von ausschlaggebender Bedeutung sind :

1. Die Bündelung der Fibrillen zu Fasern und
2. die Anordnung der Fasern zur Textur.

In sehr schneller Folge lagern sich jetzt immer mehr Fibrillen parallel nebeneinander.Oberhalb und unterhalb davon entwickeln sich ebenfalls Bündel kollagener Fibrillen,jedoch mit einer anderen Verlaufsrichtung.Obwohl alle diese Bündel oberflächenparallel verlaufen,also einen selektiv uniplanaren Verlauf parallel zur Corneaoberfläche haben,kreuzen sie sich innerhalb dieser Anordnung unter verschiedenem Winkel, ohne in dieser Hinsicht eine besondere Regelmäßigkeit zu zeigen.

Die seitliche Apposition neuer Fibrillen zu den Bündeln und die zusätzliche Apposition neuer Bündel neben den alten,sowie oberhalb und unterhalb davon,führt schließlich zu lamel-

lenartigen Fibrillenverbänden in vielfacher Schichtung.Zum Zeitpunkt der Geburt ist dieses Bild voll ausgeprägt.Die Intercellularräume zwischen den Fibroblastenetagen sind weitgehend von diesen Fibrillenlamellen ausgefüllt.Zwischen zweiFibroblastenetagen findet man 2 - 8 Kollagen-Lamellen - systeme,deren Fibrillen jeweils in verschiedenem Winkel zueinander verlaufen.

Die mehr oder weniger geknäulten bzw.gestreckten Fadenmoleküle der mit Rutheniumrot darstellbaren Glycosaminoglycane zeigen während dieser Zeit im Vergleich zu den Kollagenfi - brillen ein quantitativ entgegengesetztes Verhalten.Ihre Zahl nimmt relativ ab.Am Anfang der Fibrillenentwicklung sind sie an den Stellen gehäuft,wo sich die Filamente,Fibrillen und Bündel bilden.Auffällig ist dabei wieder die enge Beziehung zwischen den feinen Fortsätzen dieser Knäuel und den Kollagenstrukturen.An einzelnen Stellen kann eine regelmä - Bige Anordnung der GAG-Strukturen entlang der Fibrillenoberfläche,entsprechend der Querstreifungsperiode von 600-700 Å, beobachtet werden.Im Innern der sich entwickelnden größeren Fibrillenbündel und Lamellen sind sie jedoch nicht mehr,oder nur noch selten darzustellen.Am Tag 21 sind sie nur noch am Rand oder zwischen den Kollagen-Lamellen und in den übrigen fibrillenfreien Räumen nachzuweisen.

Jetzt tritt eine weitere Struktur zwischen den Fibrillen auf,deren Bedeutung weiter unten noch diskutiert werden muß, und die wahrscheinlich ebenfalls ein hochmolekulres GAG-Molekül darstellt.Es handelt sich um fädige ,bis zu 150 Å breite homogene Bänder ,die eine unregelmäßige Kontur haben, sich verzweigen und auch untereinander anastomosieren.Auffällig ist ihr Verlauf : Häufig umschlingen sie kleinere Fibrillenbündel innerhalb der Lamellen oder verlaufen an der Oberfläche von Bündeln b.z.w. Lamellen.Kleinere dieser Filamente oder Fortsätze können auch mit Einzelfibrillen in Kontakt stehen.Diese Strukturen entstehen während sich größere Fi - brillenbündel und dann die Lamellen bilden.

Die Fibrillen der Rattencornea haben bei der Geburt einen durchschnittlichen Durchmesser von 275 Å und eine Verteilungskurve der Fibrillendicke, die von 230 - 300 Å reicht und ungefähr einer Normalverteilung entspricht. Der Abstand der Fibrillen von Zentrum zu Zentrum beträgt 500 ± 150 Å, von Oberfläche zu Oberfläche der Fibrillen gemessen 200 - 400 Å.

Diskussion

Bei Besprechung der Befunde,die mit elektronenmikroskopischer Technik an der sich entwickelnden Rattencornea erhoben werden konnten,muß zunächst auf das Problem des sog. Primärstromas eingegangen werden.Als primäres Corneastroma wird der Raum zwischen Linsenbläschen und epithelialem Oberflächenektoderm bezeichnet,solange er noch nicht mit mesenchymalen Zellen besiedelt ist.Dabei ergeben sich zwei Fragen :

1.) Welche Strukturen enthält das primäre Corneastroma im elektronenmikroskopischen Bild und woher kommen sie ?

2.) Spielen diese Strukturen eine richtende Rolle für den späteren hochgeordneten Aufbau des stroma corneae und die Anordnung der in ihm enthaltenen Zellen ?

In dem Abschnitt über die Entwicklung der Cornea wurde ausführlich auf die Ansichten von Hay und Revel,Coulombre,Trelstad und anderen eingegangen,daß 1.das Primärstroma ein Sekretionsprodukt des epithelialen Oberflächenektoderms ist, 2.in diesem Primärstroma von Anfang anKollagenfibrillen vorhanden sind,die sich bis zum Zeitpunkt der Mesenchymzelleinwanderung stark vermehren und vollkommen den reifen Corneafibrillen entsprechen sollen und 3.diese Kollagenfibrillen von Anfang an in relativ regelmäßigen Lamellen angeordnet sind.Dadurch könnten sie den einwandernden Mesenchymzellen als Leitstrukturen dienen und die Entstehung der endgültigen Corneatextur ganz wesentlich beeinflussen.

Diese Vorstellungen wurden aber auf der Grundlage von Befunden entwickelt,die an den genau bekannten Verhältnissen des Hühnchens erhoben worden sind.Für die Richtigkeit dieser Ansichten beim Hühnchen sprechen einige weitere Befunde: In der adulten Cornea regt das Corneaepithel im Falle einer Verletzung die Stromazellen zur Synthese von Kollagen an,doch sind dann die Fibroblasten nicht in der Lage,die neuen Fibrillen in derselben Regelmäßigkeit (Durchmesser,Anordnung)

innerhalb der Corneaarchitektur zu produzieren.Dieses Unvermögen führt zu der bekannten Hornhauttrübung durch Narben (Schwarz und Keyserlingk 1969 a,b).

Es liegt daher der Gedanke nahe,daß 1.das Corneaepithel die Kollagensynthese der Fibroblasten in Gang setzt und beeinflußt und daß 2. die Ursache für die geordnete Fibrillenablagerung nicht so sehr in den Fibroblasten selbst,sondern in der sie umgebenden Intercellularsubstanz zu suchen ist,d.h. für die einwandernden Mesenchymzellen,in der präexistenten Lamellenstruktur des Primärstromas.Wenn diese Lamellen rechtwinklig zueinander angeordnet sind,dann müßten sich die Fibroblasten,wenn sie sich mit ihrer Längsachse parallel zu "ihrer" Lamelle anordnen,in den verschiedenen Etagen ebenfalls (innerhalb ihrer uniplanaren oberflächenparallelen Anordnung) rechtwinklig überkreuzen und ihre Sekretionsprodukte GAG und Kollagen entsprechend ablagern.

Die beschriebenen elektronenmikroskopischen Untersuchungen am Hühnchen ergeben natürlich keinen Anhalt dafür,daß diese Ansichten auch für die Entwicklung der Rattencornea zutreffen.Im Gegensatz zu den beim Hühnchen beschriebenen Befunden konnten wir in unseren Untersuchungen der embryonalen Rattencornea kein deutliches Primärstroma feststellen.Nach der Abschnürung des Linsenbläschens verläuft die Entwicklung bei der Ratte nämlich so schnell,daß der Eindruck entsteht,als wären die Mesenchymzellen schon von Anfang an in diesem Raum vorhanden,würden sich später nur vermehren,dichter und regelmäßiger anordnen.

In dem epithelialen Oberflächenektoderm der Rattencornea fanden sich darüberhinaus nur wenig Zellorganellen,die für eine sekretorische Eiweißsyntheseleistung verantwortlich zu machen wären .Auch der beim Hühnchen beschriebene enge zeitliche Zusammenhang zwischen der starken Entwicklung sekretorischer Zellorganellen und der Dickenzunahme des Primärstromas ließ sich demzufolge nicht bestätigen.

Diese Ansichten beruhen auch nicht so sehr auf elektronenmikroskopischen,sondern mehr auf autoradiographischen Untersuchungen,d.h. auf Einbaustudien markierter Aminosäuren.

Es erscheint nicht ausgeschlossen,daß diese von den Epithelzellen auch zur Synthese anderer Proteinarten verwendet werden .Es liegt daher wohl näher,die auch in unseren Untersuchungen erkannten eiweißsekretorischen Zellorganellen als Ausdruck einer Beteiligung der Epithelzellen an der Basalmembranbildung und nicht an der Synthese der Intercellularsubstanz des Stromas zu deuten (Pierce,1966).

Kollagenfibrillen konnten vor der Mesenchymzelleinwanderung nicht nachgewiesen werden.Auch bei den vereinzelt vorkommenden Kollagenfibrillenvorstufen in Filamentform konnte bis zu diesem Zeitpunkt eine wesentliche Vermehrung nicht festgestellt werden.Einschränkend muß jedoch immer wieder darauf hingewiesen werden,daß die Entwicklung beim Rattenembryo einmal sehr viel später beginnt,aber dann sehr viel schneller abläuft.Die Zeit zwischen Linsenbläschenabschnürung und Mesenchymzellinvasion ,die beim Hühnchenembryo 2 1/2 Tage beträgt,dauert beim Rattenembryo nur einige (ca.1o) Stunden. Die Aufstellung einer genauen zeitliche Sequenz und eine entsprechende Deutung der Befunde ist deshalb sehr schwierig.

Außer den fehlenden Kollagenfibrillen konnten wir auch keine Anordnung anderen Materials,z.B. der GAG-Makromoleküle , in Lamellenform feststellen,sodaß die erhobenen Befunde am Rattenembryo die Ansichten über das primäre Corneastroma,wie es für das Hühnchen geschildert wurde,nicht bestätigen.

In den elektronenmikroskopischen Bildern erscheint der Raum zwischen Linsenbläschen und Ektoderm zunächst optisch weitgehend leer.Jedoch lassen sich bei genauer Darstellung mit der Ruthenimmethode die schon weiter oben beschriebenen teilweise stark geknäulten Filamente darstellen.In Analogie zu Befunden an anderen Bindegewebsformen kann angenommen werden,daß es sich hierbei um die erwähnten GAG-Makromoleküle handelt (Merker,1971,1971 a;Serafini-Fracassini et al. 197o).

Man muß also annehmen,daß das primäre Corneastroma angefüllt ist mit einem lockeren Netzwerk dieser fädigen MPS-Protein-

Komplexe,deren Entstehungsort ohne Zweifel in den am Augenbecherrand in genügend großer Zahl vorhandenen Mesenchym - zellen lokalisiert werden muß.Vom Augenbecherrand gelangen diese Makromoleküle auch in die zentraleren Partien des Primärstromas,wo sie in zufälliger Verteilung ohne jede Vorzugsrichtung oder augenscheinliche Ordnung elektronenmikrosko - pisch faßbar sind.Es erscheint durchaus verständlich,daß in der wasserreichen,lockeren und weichen Intercellularsubstanz des primären Stromas eine Diffusion solcher Strukturen mög - lich ist.

Das primäre Corneastroma wäre demnach nur als Sonderfall b. z.w. lokalisierte Erweiterung des mesenchymalen Intercellulärraumes zu betrachten.So wäre auch das vereinzelte Vorkommen von Kollagenfibrillenvorstufen einleuchtend zu erklären. Die Strukturen im Interzellulärraum sind also als Syntheseprodukte der umliegenden Mesenchymzellen zu betrachten.Sie sind in das primäre Corneastroma diffundiert und liegen in zufälliger,d.h.regelloser Anordnung.

Wie bei den Befunden beschrieben,überkreuzen sich bei der Ratte die aus parallelen Fibrillen bestehenden Lamellen in der reifen Cornea nicht rechtwinklig,wie beim Hühnchen,sondern unter verschiedenen Winkeln,ohne daß ein Vorzugswinkel zu erkennen ist.In dieser Hinsicht besteht also ein deutlicher Unterschied zwischen Ratte und Hühnchen.Man kann vermuten,daß dieser Unterschied mit den geschilderten Abweichungen während der Entwicklung des Primärstromas bei Hühnchen und Ratte zusammenhängt.So konnten wir auch bei den einwanderndenMesenchymzellen eine bestimmte Vorzugsrichtung oder Anordnung in Schichten während der Einwanderung und unmittelbar nach Erreichen des Corneazentrums nicht erkennen.Die Zellen wandern hier offensichtlich ohne irgendeine ihre Anordnung präformierende Leitstruktur ein,und der Winkel,unter dem sich ihre Längsachsen und die später gebildeten Fibrillenlamellen kreuzen wäre daher zufällig.

Allerdings darf nicht vergessen werden,daß bereits zu diesem Zeitpunkt physikalische Kräfte auf das Corneastroma einwir - ken.Das beruht einmal auf dem typischen Aufbau als schwach ge-

bogene flache Scheibe,die einen bestimmten Verlauf der Kraftlinien mit sich bringt,zum anderen werden aber in zunehmen - dem Maße Kräfte wirksam,die durch die Vergrößerung der Augenanlage entstehen.Sowohl Linse,vordere Augenkammer und Glas - körper entwickeln b.z.w. vergrößern sich und lassen einen Zug von der Peripherie her und einen Druck von der vorderen Augenkammer her auf die Cornea einwirken.Dadurch kann natürlich aus einer zunächst regellosen Anordnung sehr schnell eine gerichtete Lagerung entstehen.

Die von Hay und Revel erwähnte Abflachung der Mesenchymzellen unmittelbar vor Beginn der Einwanderung fanden sich bei der Ratte nicht,Vielmehr zeigten hier die Zellen eine rundlich-polygonale Gestalt mit eher plumpen Zellfortsätzen.Solche Formen sind von der Fibroblastenwanderung in Zellkulturen her bekannt (v.Keyserlingk,1970).Erst nachdem die Zellwanderung zu Ende ist kommt es zur Abflachung des Zelleibes und Verwandlung der plumpen Pseudopodien in lange,schmale Zellausläufer.

Nach der Besiedelung des Primärstromas mit Mesenchymzellen kommt es in ihnen zu einer auffälligen Entwicklung sekretorischer Zellorganellen,insbesondere eines dichten mit Ribosomen besetzten Membranensystems,des rauhen ER,und des Golgikomplexes.Eine massive Synthese und Sekretion von GAG-Makromolekülen und Kollagen geht mit dieser Entwicklung einher. Das elektronenmikroskopische Bild dieser Synthese- und Sekretionstätigkeit unterscheidet sich nicht von dem in anderen Bindegewebsformen (Rohr,1965;Schwarz,1964;Ross und Benditt, 1965;Merker,1971,1971 a).Auch die extreme Abflachung der Zellen beeinträchtigt diese Aktivität nicht.

Sowohl die Glycosaminoglycane als auch das Tropokollagen wird also in den Fibroblasten des Corneastromas synthetisiert,in den Extrazellulärraum ausgeschieden und an der äußeren Zelloberfläche als dichte,ungeordnete Masse abgelagert ("marginal condensation").Unter dem Einfluß der jetzt als Matrize wirkenden GAG-Makromoleküle ,beginnt sich das TC zu strecken, an die GAG anzulagern und so den zentralen Kern der späteren Kollagenfibrille zu bilden ("Nucleation").Durch Anlagerung weiterer TC-Moleküle an den durch die Matrize annähernd ober-

flächenparallel gerichteten Kern nimmt die Fibrillendicke zu ("Aggregation") bis bei ca.150 Å die Querstreifung sichtbar wird.Die endgültige Fibrillendicke in der Rattencornea beträgt 230 - 300 Å mit einem Häufigkeitsmaximum bei 275 Å (siehe auch Jakus,1954).

Mit zunehmender Corneareife nimmt die Zahl der GAG-Makromoleküle relativ zu den sich stark vermehrenden Kollagenfibrillen ab.Die Zellen bilden ihre sekretorischen Organellen zurück und verwandeln sich in die sehr wenig stoffwechselaktiven Keratocyten (analog zu den Fibrocyten in anderen Bindegewebsformen).

Die hier vorallem interessierende Frage ist,auf welche Weise es zu dieser oberflächenparallelen Fibrillenanordnung kommt,b.z.w. wenn diese durch die GAG-Matrizen geprägt wird, welche Kräfte dann diese Schablonen oberflächenparallel anordnen.

Aus den angeführten Befunden geht hervor,daß keineswegs von Anfang an eine,auch nur andeutungsweise,Ordnung dieser Art besteht,daß vielmehr auch die Glycosaminoglycane in zufälliger Verteilung im Primärstroma liegen.Nach Besiedelung mit Mesenchymzellen wird massenhaft GAG produziert und zwar scheint dabei zuerst die GAG-Produktion im Vordergrund zu stehen und erst danach die gleichzeitige Produktion von GAG und TC einzusetzen.

In dieser ersten Phase kann man die Verteilung von GAG im Primärstroma mit derjenigen von Spaghetti in einem Kochtopf vergleichen.Dazwischen liegen unregelmäßig verteilt die einwandernden,noch nicht geordneten Zellen.Diese Verhältnisse werden durch die im gesamten Auge ablaufenden Wachstumsprozesse in ganz bestimmter Weise beeinflußt :

1.) Das Wachstum des Augenbechers führt zu einer Vergrößerung des Abstandes der Augenbecherränder.Dadurch werden,um im Bilde zu bleiben,die Spaghetti in Richtung auf den Augenbecherrand gezogen.
2.) Durch die Entstehung des Glaskörpers und das Linsenwachs-

tum,die Entstehung und Vergrößerung der Augenkammer,das Einwachsen der Iris zwischen Linse und Hornhaut wird die Augenanlage zusätzlich vergrößert.Die damit einhergehende Erhöhung des intraokularen Druckes,der die Cornea nach vorne vorwölbt,führt schließlich zu einer Dehnung der Knäuel aus GAG-Fadenmolekülen.
3.) Mit der Differenzierung des den Augenbecher umhüllenden Mesenchyms zu einem straffen Bindegewebe,der Sclera,entwikkeln sich die Ansätze der äußeren Augenmuskeln,die eine zusätzliche Dehnung der äußeren Augenhaut bewirken.Da Cornea und Sclera kontinuierlich ineinander übergehen,werden die Zug-,Dehnungs- und Scherkräfte,die die Muskeln auf die Sclera ausüben,auf die Cornea übertragen.

Alle diese auf die Cornea einwirkenden physikalischen Kräfte haben eine gemeinsame Resultante,die ein Auseinanderziehen der GAG-Fadenmoleküle und dadurch eine Abplattung und gleichzeitige oberflächenparallele Lagerung der Knäuel bewirkt. Dadurch kommt es zu einer annähernd oberflächenparallelen Längsanordnung der Zellen und der Glycosaminoglycane und schließlich auch der Fibrillenbündel.Im weiteren Verlauf üben die Zellmembranen und die langen Zellausläufer,an denen die "marginal condensation" stattfindet,sowie die GAG-Matrizen,an denen es zur "Nucleation" und "Aggregation" kommt,eine richtende Wirkung auf die zur Textur sich formierenden Fibrillen aus.

Man wird also den auf die Cornea einwirkenden,durch die Wachstumsprozesse hervorgerufenen physikalischen Kräften eine wichtige Rolle bei der Ausbildung der Textur des stroma corneae zuschreiben können.Sie erzwingen eine Streckung des GAG-Netzwerkes,auf dessen Matrize sich die Zellen anordnen und die kollagenen Fibrillen aufwachsen.Schließlich wird man noch den ordnenden Einfluß der langen,plattenförmigen Zellfortsätze zu berücksichtigen haben.

Interessant ist die Darstellung einer zweiten GAG-Struktur durch die Rutheniummethode.Diese Makromoleküle sind im Gegensatz zu den typischen GAG nicht geknäult,sind dicker,las-

sen sich über längere Strecken verfolgen und weisen keine so engen Beziehungen über feine Filamente zur Fibrillenoberfläche auf. Aus ihrem Verlauf kann auf ihre Funktion geschlossen werden. Sie umspinnen die Fibrillenbündel und Lamellen. Es kann vermutet werden, daß diese Form der GAG-Moleküle mitverantwortlich ist für die Bündelung der Fibrillen, die Anordnung in Lamellen und die Regulierung der Faserdicke.

## Zusammenfassung

In dieser Arbeit wird die Entwicklung des stroma corneae beim Hühnchen referiert,da hier die Verhältnisse bisher am besten bekannt sind.In diesem Zusammenhang wird ausführlich auf das Problem der Fibrillogenese eingegangen.

Da vergleichbare Untersuchungen über die Rattencornea noch fehlen,wurde lichtmikroskopisch,insbesondere aber mit Hilfe des Elektronenmikroskopes,an Rattenembryonen vom Tage 11 an bis zur Geburt (Tag 21) die Entwicklung des Hornhautstromas untersucht.

Im epithelialen Oberflächenektoderm wurden keine Zellstrukturen gefunden,die für eine Beteiligung des Epithels beim Aufbau des stroma corneae sprechen.

Ein deutlich ausgeprägtes Primärstroma,wie beim Hühnchen beschrieben,konnte bei der Ratte nicht nachgewiesen werden.Vielmehr erscheint vor der Einwanderung von Mesenchymzellen der Raum zwischen Linsenbläschen und Ektoderm als eine lokalisierte,optisch weitgehend leere Erweiterung des Intercellulärraumes des den Augenbecher umhüllenden Mesenchyms.

Das nach der Mesenchymzelleinwanderung entstehende Hornhautstroma erscheint als ein Sekretionsprodukt der Mesenchymzellen,die weniger als einen halben Tag nach Abschnürung des Linsenbläschens vom Oberflächenektoderm, vom Augenbecherrand her einwandern.

Die ungeordnet einwandernden Mesenchymzellen differenzieren sich zu Fibroblasten,sezernieren massenhaft Glycosaminoglycane und Kollagen.Gleichzeitig vermehren sie sich durch lebhafte Zellteilung.In diesem frühen Stadium ist eine bestimmte Ordnung in diesem Raum nicht erkennbar.

Physikalische Kräfte,die im wesentlichen durch das Wachstum der gesamten Augenanlage entstehen,führen durch Deh-

nung der Knäuel aus GAG-Fadenmolekülen zu einer oberflächenparallelen Anordnung dieses Netzwerkes, der Fibroblasten und der von ihnen sezernierten Kollagen-Fibrillen-Lamellen. Bis zur Geburt entstehen bis zu 1o Fibroblastenschichten, zwischen denen sich jeweils 2-8 Lamellen in oberflächenparalleler Anordnung befinden. Innerhalb der Lamellen verlaufen die Fibrillen weitgehend parallel. Die Lamellen selbst überkreuzen sich unter verschiedenen Winkeln.

Trotz der extremen bipolaren Abflachung der Fibroblasten verläuft die Fibrillogenese unter demselben morphologischen Bild wie in anderen Bindegewebsformen.

Die Bündelung der Fibrillen zu Fasern und die Anordnung der Fasern zur Textur, sowie der Einfluß der Glycosaminoglycane und physikalischer Kräfte auf die Entstehung der selektiv uniplanaren Ordnung im Hornhautstroma wird diskutiert. Die Unterschiede der Entwicklung des Hornhautstromas beim Hühnchen- und Rattenembryo werden besprochen.

Abb. 1

Polarisationsoptisches Übersichtsbild der erwachsenen Rattencornea. Das Bild zeigt die Doppelbrechung der Gesamtcornea.

Abb. 2

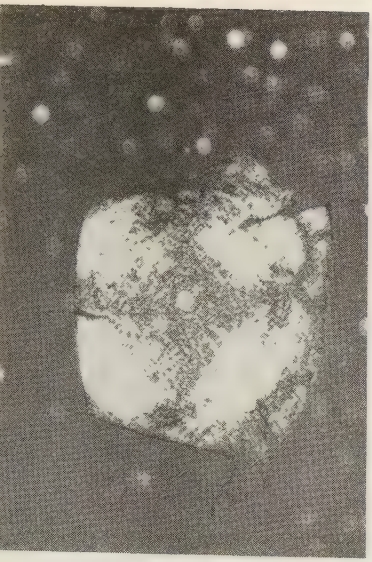
Polarisationsoptisches Bild eines vergrößerten Ausschnittes aus der erwachsenen Rattencornea.
Die sich z.T. rechtwinklig überkreuzenden (————→) Fibrillenbündel sind zu erkennen.
Vergrößerung 1 : 224

Abb. 3

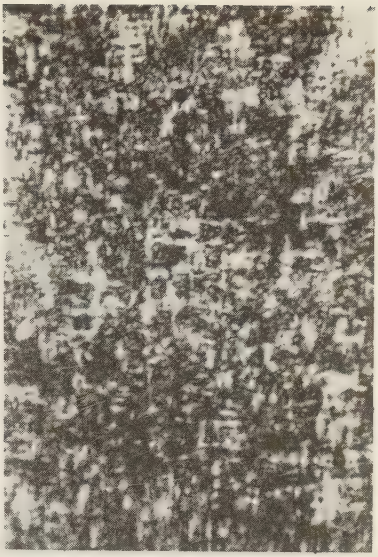
Übersichtsbild eines embryonalen Rattenkopfes (Querschnitt) vom Tag 16.
Cornea (—/—→) und Linse (—//—→) sind deutlich zu erkennen. Der Glaskörper (—///—→) ist noch wenig entwickelt.
(————→) = Augenlider.
Vergrößerung 1 : 22
Färbung: Hämatoxilin-Eosin

Abb. 4

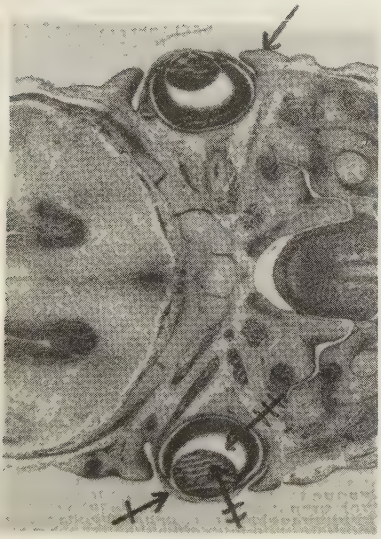
Übersichtsbild eines embryonalen Rattenkopfes (Querschnitt) vom Tag 17.
Vergrößerung 1 : 18
Färbung : PAS - HE



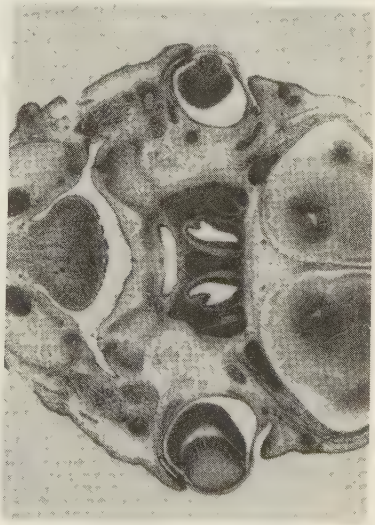
1



2



3



4

Abb. 5

Übersichtsbild des Auges vom Rattenembryo Tag 16. M = das die Augenanlage umhüllende Mesenchym. E = epitheliales Oberflächenektoderm auf der Anlage des Augenlides. In der Cornea erkennt man den Aufbau aus mehreren andeutungsweise oberflächenparallelen Schichten (——→), G = Glaskörper , N = N.opticus mit A.hyaloidea, L = Linse, W = inneres Blatt der Augenbecherwand (spätere Retina) , ⁄——→ = äußeres Blatt der Augenbecherwand (späteres Pigmentepitnel) , ⁄⁄——→ = Augenbecherrand.
Vergrößerung : 1:56 Färbung : HE

Abb. 6

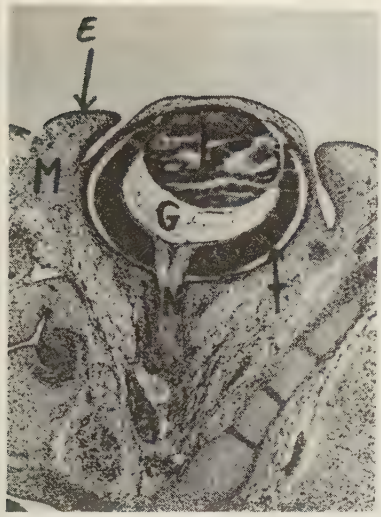
Übersichtsbild des Auges vom Rattenembryo Tag 17. S = artefiziell erweiterter Rest des Sehventrikels.
Vergrößerung 1 : 45 Färbung : PAS

Abb. 7

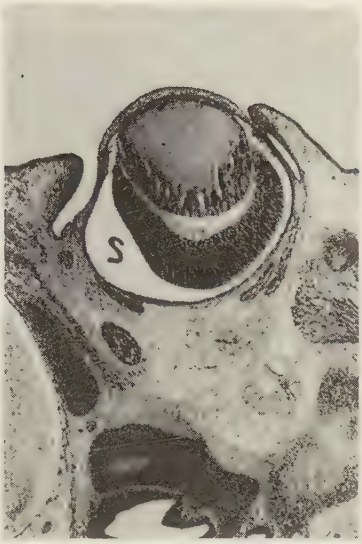
Übersichtsbild von der Cornea des Rattenembryos Tag 17. Corneaepithel (——→), Linsenepitehl (⁄⁄——→) und Corneaendothel (⁄——→) sind deutlich zu erkennen. Man erkennt den Aufbau der Linse aus Linsenfasern ( Lf ). xx = Augenbecherrand, man erkennt noch wie an der Umschlagstelle äußeres in inneres Blatt übergeht. x = Augenlid in Höhe des Augenbecherrandes. Vergrößerung 1 : 140 Färbung: Azan

Abb. 8

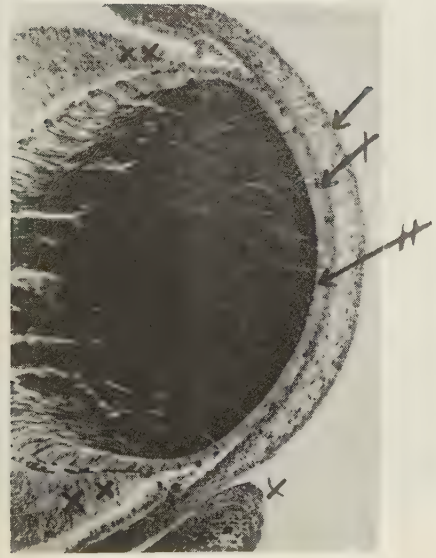
Übersichtsbild von der Cornea des Rattenembryos Tag 18. Die Augenlider sind geschlossen (——→). Man erkennt den Schichtenbau der Cornea, sie ist kompakter geworden und scheint wasserärmer als am Tag 17. Die Schichten sind dichter gepackt (⁄——→). X = vordere Augenkammer. Corneaepithel und - endothel, vorderes Linsenepithel sind deutlich sichtbar. Lf = Linsenfasern. Augenkammer (vordere) und Subconjunktivalraum sind artefiziell erweitert.
Vergrößerung 1 : 140 Färbung: PAS




5




6



7

8

Abb. 9

Ausschnittsvergrößerung aus dem primären Corneastroma mit typischen GAG-Makromolekülen (⟶) bestehend aus einem geknäulten Zentrum und feinen Filamenten (⟶//⟶). Dazwischen befinden sich einzelne Filamente in engem Kontakt mit dem GAG ( x ). Ansonsten erscheint der Intercellulärraum elektronenoptisch leer.
Vergrößerung 1:105000
Cornea des Rattenembryos Tag 13

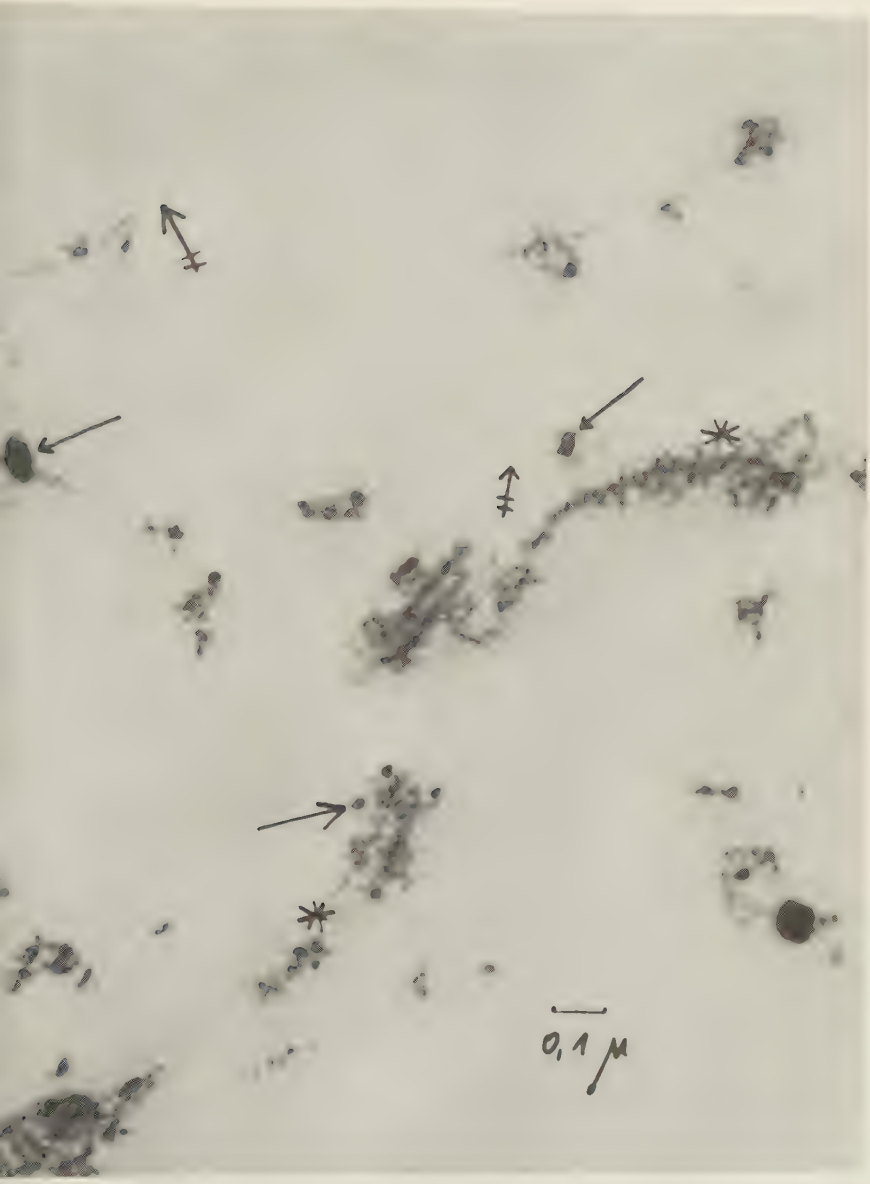

0,1 µ

Abb. 1o

Cornea des Rattenembryos vom Tag 14
In das primäre Corneastroma einwandernde Mesenchymzelle ( M) mit plumpen Zellfortsätzen ( x ),viel freien Ribosomen und einigen Hohlräumen des endoplasmatischen Retikulums (ER).
Neben dieser Zelle bereits abgeflachte Fibrozytenfortsätze ( Ff ).Im mesenchymalen Intercellulärraum finden sich einzelne kleine Fibrillenbündel (⟶) ohne deutliche Vorzugsrichtung. I = Intercellulärraum.
Vergrößerung 1 : 21ooo

μ
Tf
Tf
Tf
Tf
Tf
ER
ER
M

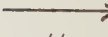
Abb. 11

Cornea eines Rattenembryos vom späten Tag 14. Mesenchymzellen im stroma corneae kurz nach der Besiedelung. Deutliche Vermehrung des rauhen ER ( ER ) und der Mitochondrien ( M ). Der Golgi-apparat ist vergrößert ( G ).
Bipolare Umformung der Zellen. Im mesenchymalen Interstitium liegen kleine Filament-Fibrillen-bündel ( x ). An einzelnen Stellen (⟶ ) kann man Andeutungen der "marginal condensation" erkennen.
Vergrößerung 1 : 21ooo

μ
ER
M
ER
ER
M
ER

Abb. 12

Cornea eines Rattenembryos vom späten Tag 14.

 = " marginal condensation " .

= Zellmembran.

Vergrößerung 1 : 49000

μ

Abb.13

Cornea eines Rattenembryos vom Tag 15.
Die Mesenchymzellen haben sich zu Fibroblasten differenziert. F = Fibroblasten. Sie haben ein stark entwickeltes rauhes ER ( ER ).Im mesenchymalen Interstitium ( I ) finden sich längs- (⟶) und quer - (⟶//⟶) geschnittene Fibrillenbündel.Beginn der Querstreifungsbildung,sog.kontinuierlich Querstreifung (21o A).Vereinzelt "marginal condensation" ( x ).
O = Polysomen.
Vergrößerung 1 : 49ooo

μ
ER

Abb. 14

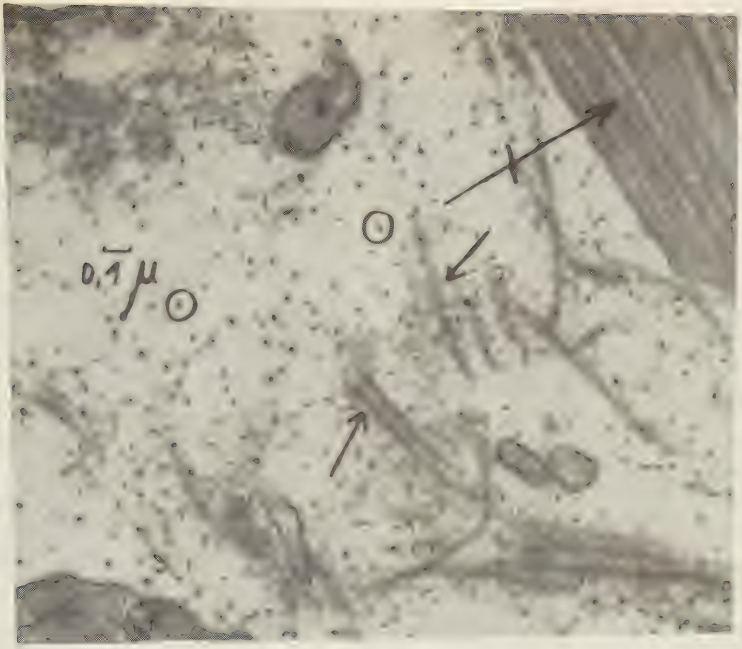
Cornea eines Rattenembryos vom Tag 16.
Mehrere abgflachte Fibroblastenfortsätze ( F) im stroma corneae.Im mesenchymalen Interstitim ( I ) sieht man sich überkreuzende,locker gepackte Fibrillenbündel b.z.w. Einzelfibrillen.Es beginnt sich,eine Schichtenbildung anzudeuten.
Vergrößerung 1 : 49000

F
F
F
F
F
μ

Abb. 15



Cornea eines Rattenembryos vom frühen Tag 16.
Kollagene Fibrillen (——→) und typische
GAG-Makromoleküle ( Kreis ) aus dem Corneastroma.
Enge räumliche Beziehung zwischen GAG und Kolla-
genfibrillen.Netzartige Verbindung der GAG.
Häufig findet sich eine andeutungsweise regelmäßi-
ge Zuordnung der GAG-Moleküle zu den Fibrillen
( VVVVV ). ( ——→) = Fibrillenbündel,innerhalb der
Bündel finden sich praktisch keine GAG.
Vergrößerung 1 : 63000.


0,1 μ

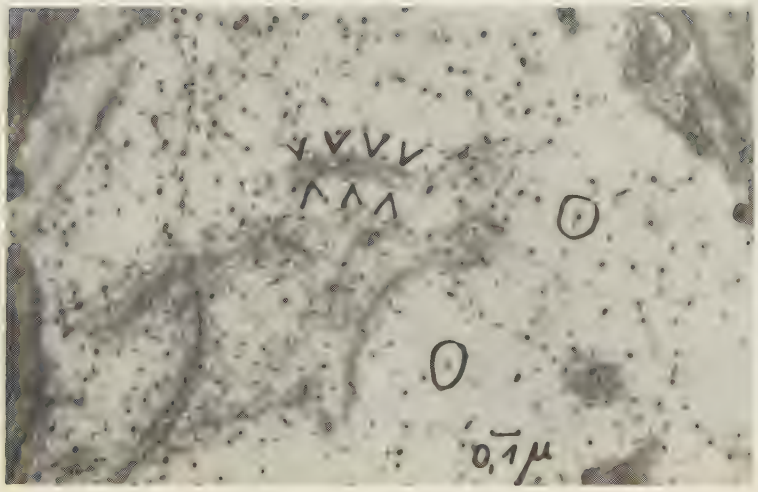

0,1 μ

Abb. 16

Cornea eines Rattenembryos vom späten Tag 16.
Übersichtsbild des stroma corneae.Die Fibroblasten (F) sind mehrschichtig in mehreren Lagen angeordnet.Es beginnt jetzt eine verstärkte Fibrillogenese.Insgesamt befinden sich bis jetzt noch relativ wenig fibrilläre Strukturen im mesenchymalen Interstitium (I).
E = Corneaepithel ——→ = Fibrillen.
Vergrößerung 1 : 6000

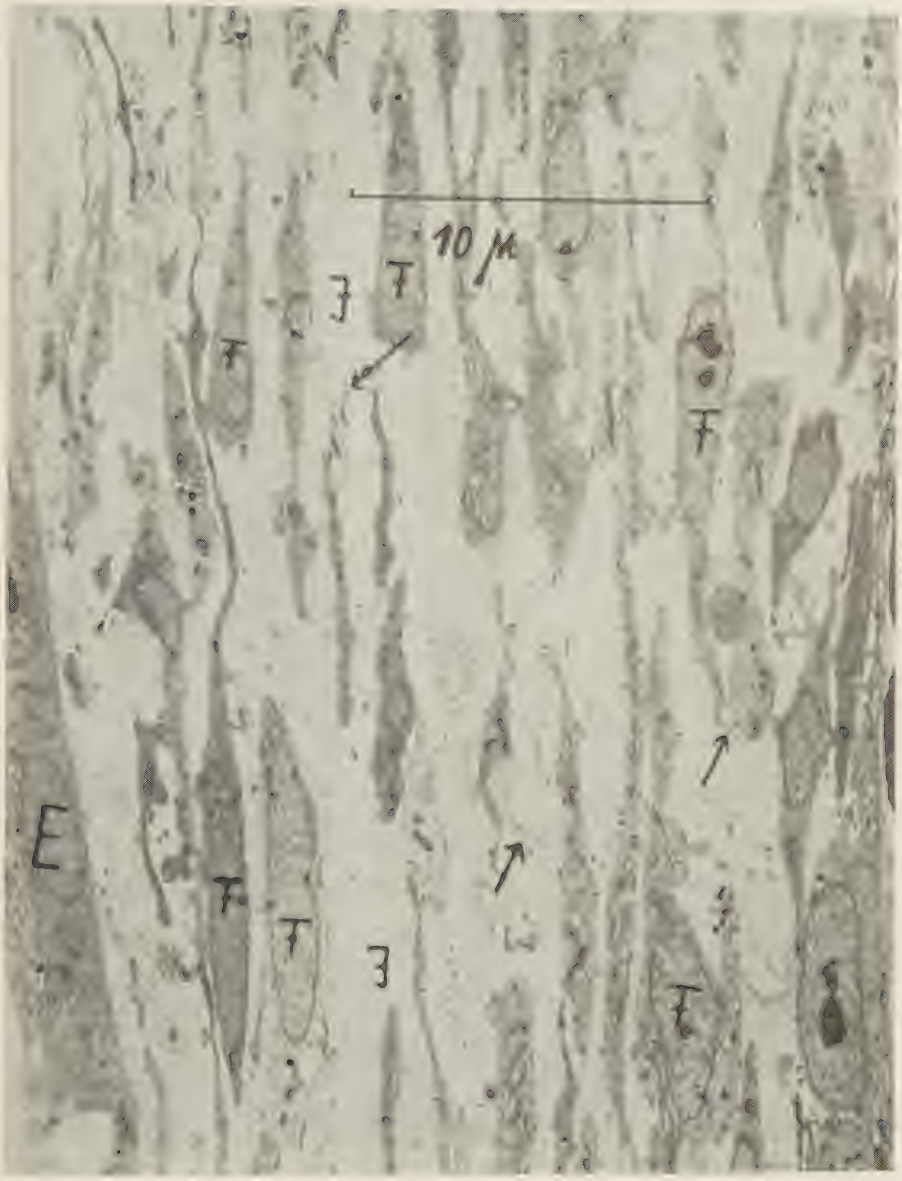

10 µ
E

Abb. 17

Cornea eines Rattenembryos vom späten Tag 18.
Übersichtsbild des stroma corneae. Im Intercellulärraum starke Fibrillenbildung und Bündelung weiter deutlich fortgeschritten. I = Intercellulärraum.
Fibroblasten ( F ) stehen dicht und sind reich an ER.
Im Hohlraumsystem des ER erkennt man elektronendichten Inhalt (vgl. dazu Abb. 13).
Im Corneaepithel (E ) findet eine Mitose statt.
Vergrößerung 1 : 10000

E
E
F
F
F
F
F
F
F
F
F
F
F
1μ

Abb.18

Cornea eines Rattenembryos vom Tag 22.
——→ = Darstellung einer zweiten GAG-Struktur,die nicht geknäult ist,dicker ist und sich länger verfolgen läßt.
Diese Makromoleküle umspinnen die Fibrillenbündel.
Die adulten Verhältnisse sind weitgehend erreicht.Die Querstreifung der Fibrillen ist deutlich zu erkennen (——/——→) .
Vergrößerung 1 : 87 500

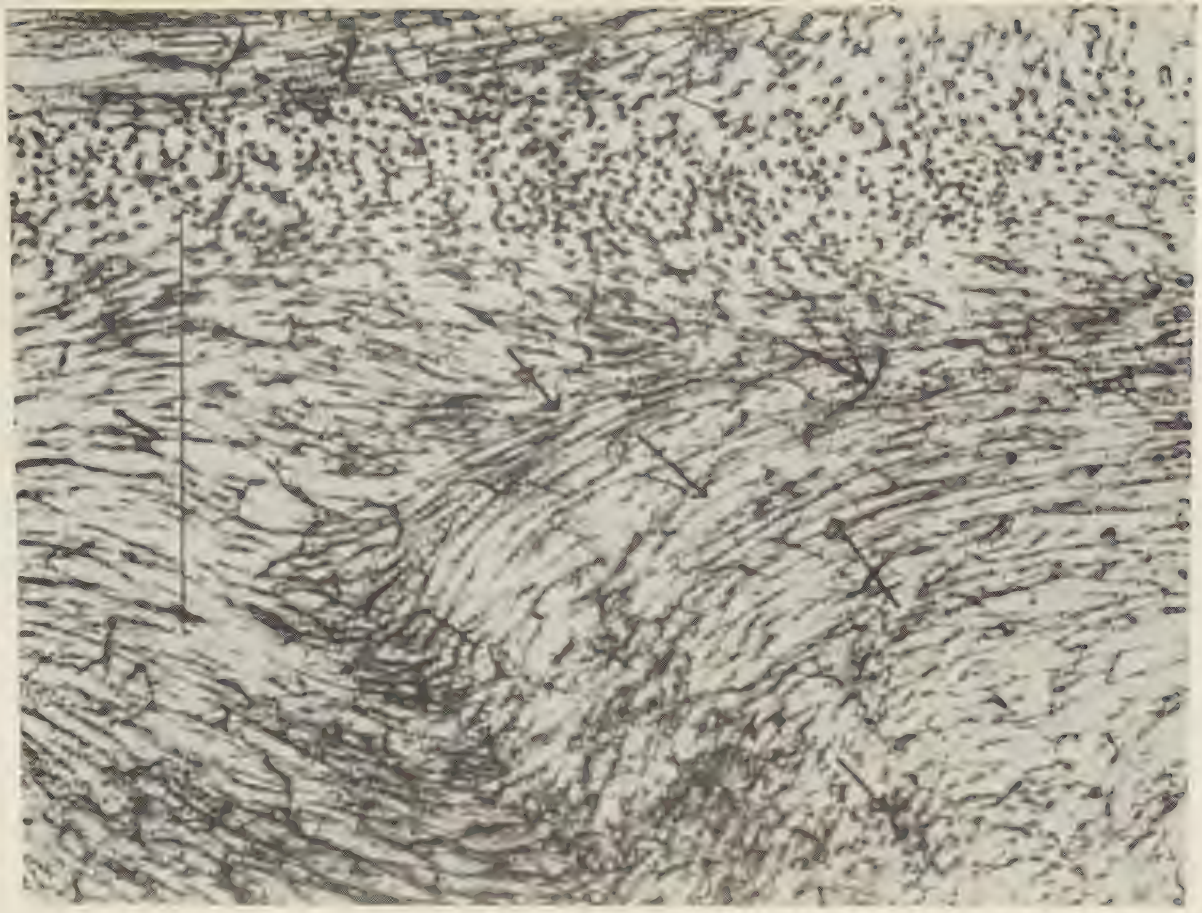


Abb.19

Cornea einer erwachsenen Ratte.
Die Fibrillen sind regelmäßig in Schichten angeordnet. Wie in anderen straffen Bindegeweben treten die Zellen gegenüber den Fibrillen in den Hintergrund. Die Schnittebene dieses Bildes ist nicht genau oberflächenparallel.
Vergrößerung 1 : 16 000

μ

Literaturverzeichnis


Coulombre,A.J.;Coulombre,J.L.: Control of the development of corneal transparency by pituitary grafts. Anat.Rec.. 133 264-265 (1959)

The development of the structural and optical properties of the cornea. In:The structure of the eye, 405-420.Ed.G.K.Smelser.Academic Press,New York -London 1961

Corneal development III.The role of thyroid in dehydration and the development of transparency. Exp.Eye Res. 3,105-114 (1964)a

Coulombre,A.J.: Problems in corneal morphogenesis. Advances in Morphogenesis,Vol.4,81-109 (1964)

Clara,M.: Entwicklungsgeschichte des Menschen. Heidelberg,1967

Dische,Z.: The glycans of the mammalian lens capsule - a model of basement membranes. In: Small blood vessel involvment in diabetes - mellitus.Amer.Just.biol.Sci. Wash.D.C. 201-215 (1964).

Dziewiatkowsky,D.: Intracellular synthesis of chondroitin sulfate.J.Cell.Biol. 13 359-364 (1962)

Glücksmann,A.: Zur Entwicklung der vorderen Augenkammer,des Glaskörpers und der Hornhaut beim Menschen,bei einigen Säugern und Sauropsiden.Z.Anat.Entwickgesch.88 529-610 (1929)

Green,K.: Active control of corneal thickness. In:Biochemistry of the eye.Karger, Basel,1968

Hay,E.;Revel,J.P.: The fine structure of the developing avian cornea. Basel-New York,1969

Herrmann,H.: Some problems of protein formation in the sclera and cornea of the chick.In: Symposium on the chemical basis of development.John Hopkins Press 329-338, Baltimore,1958

Jakus,A.M.: Studies on the cornea I.The fine structure of the rat cornea. Amer.J.ophthalmol. 38,Number 1,Part II 40-52 (July 1954)

Studies on the cornea II.The fine structure of Descemets membrane.J.biophys. biochem.cytolog.,Suppl.2,243-252 (1956)

Keyserlingk,D.: Über die Bedeutung des intracellulären kontraktilen Systems für die Lokomotion der Fibroblasten.Cytobiologie 1, 259-272 (1970)

Karmascin,L.: Elektronenmikroskopische Untersuchungen des Fasersystems der embryonalen Hornhaut.Acta morph.Acad.Sci.hung.11 375-385 (1962)

Langham,E.: The regulation of corneal hydration. In:The cornea world congress.21-29 Butterworths,London 1965

Lauber,H.: Die Hornhaut.In:v.Möllendorffs Handbuch.III/2 ,9-59 (1936)

Lopashov,G.;Stroeva,O.; Morphogenesis of the vertebrate eye. Adv.Morphogenesis 1 ,331-377 Academic Press,New York 1961

Maurice,D. : The chemical and physical basis of corneal transparency.In:Biochemistry of the eye. 51-61.Karger Basel-New York 1968

The structure and transparency of the cornea.J.Physiol.136 , 263-286 (1957)

The cornea and sclera.In: The eye. Ed.Hugh Davson.Vol.I,vegetative Physiology and biochemistry.289-368. Academic Press,New York-London 1962

Matthews,M.: The interaction of proteoglycans and collagen-model systems.In:Chemistry and molecular biology of the inter - cellular matrix.Ed.E.A.Balazs Vol.II,1155-1169.Academic Press, London-New York,1970

Merker,H.J.: Elektronenmikroskopische Untersuchungen über die Fibrillogenese in der Haut menschlicher Embryonen. Z.Zellforsch. 53 ,411-430 (1961)

The fine structure of connective tissue formation.In:Metabolic pathways in embryonic tissues.1.Symposium des Sonderforschungsbereiches 29. 1971. (im Druck 1971 a)

Merker,H.J.;Struwe,K.: Elektronenmikroskopische Untersuchungen zum Problem der Sekretion der bindegewebigen Intercellularsubstanz. Z!Zellforsch. im Druck (1971)

Merker,H.J.;Greiling,H.;Günther,Th.: Bildung von Hyaluronsäure in Ascites-Tumorzellen.Z.Krebsforsch. 490-496

Myers,D.;Mighton,T.;Rayus,D.:
Acid mucopolysacharides closely associated with collagen fibrils in normal human synovium
J.Ultrastructure Res. 28,203-219 (1969)

O'Connell,J.J.;Low,F.N.:
A histochemical and fine structural study of early extracellu lar connective tissue in the chick embryo.
Anat.Rec. 167 ,425-430 (1970)

O'Rahilly,R.;Meyer,D.:
The early development of the eye in the chick.Acta anat.36,20-58 (1959)

Payrau,P.: Biochemistry and immunochemistry of the cornea.In:Biochemistry of the eye.Karger,Basel-New York,1968

Pierce,G.B.: The development of basement membranes of the mouse embryo.Develop. Biol. 13 231 (1966)

Revel,J.P.;Hay,E.D.:
Fine structure of the developing chick cornea.Anat.rec.151,492-493 (1965)

An autoradiographic and electronmicroscopic study of collagen synthesis in differentiating cartilag.In:
Z.Zellforsc h.61,110-144 (1963)

Rohen,J.W.: Das Auge und seine Hilfsorgane.In:
Handbuch der mikroskopischen Anatomie des menschen.Bd.III 4.Teil .Berlin-Heidelberg-New York 1964

Rohr,H.: Die Kollagensynthese in ihrer Beziehung zur submikroskopischen Struktur der Osteoblasten.Virchows Arch. 338 342- 354 (1965)

Ross,R.;Benditt,E.P.: Wound healing and collagen formation V.Quantitative electronoscopic radioautographic observations of Prolin-$H_3$ utilization by fibroblasts.J.Cell Biol. 27 83-106 (1965)

Schwarz,W.: Fibrillogenese und Bildung der elastischen Fasern.Arch.Biol. 75 369-370 (1964)

Elektronenmikroskopische Untersuchungen über die Differenzierung der Cornea- und Sclerafibrillen des Menschen.
Z.Zellforsch.38,78-86 (1953 b)

Schwarz,W.: Elektronenmikroskopische Untersuchungen über den Aufbau der Sclera und Cornea des Menschen.Z.Zellforsch. 38 26-49 (1953 a )

Electronmicroscopical studies on the fibrillogenesis in the human cornea. In: The structure of the eye. Ed.G.K. Smelser.Academic Press New York - London 1961

Schwarz,W.;Keyserlingk,D.:Über die Feinstruktur der menschlichen Cornea mit besonderer Berücksichtigung des Problems der Transparenz. Z.Zellforsch. 73 ,54o - 548 (1966).

Elektronenmikroskopische Untersuchungen an der Cornea,Sclera,Haut und Flosse eines durchsichtigen Fisches (ambassis lala).Z.Zellforsch. 1o2,78-84 (1969 b)

Elektronenmikroskopische Untersuchungen an humanen Hornhautnarben und an einem getrübten Hornhauttransplantat.Virch. Arch.Abt.A Path.Anat.374,115-128 (1969 a)

Schwarz,W.;Merker,H.J.:Die Fibrillogenese in verschiedenen Bindegewebsformen des menschlichen Embryos.Beitr.Silikoseforsch.S-Bd.Grundfragen Silikoseforsch.4,231-247 (196o)

Schwarz ,W.;Merker,H.J.;Kutzsche,A.: Elektronenmikroskopische Untersuchungen über die Fibrillogenese in Fibroblastenkulturen.Z.Zellforsch.56,1o7-124 (1962)

Serafini-Fracassini,A.;Wells,P.J.;Smith,J.W.: Studies on the interactions between GAG and fibrillar collagen.In:Chemistry and molecular biology of the intercellular matrix.12o1-1215.Ed.E.A.Balazs Academic Press,New York-London ,197o

Smelser,G.K.;Ozanics,V.: New concepts in anatomy and histology of the cornea.In:The cornea world congress.Ed.J.H.King,Jr. and J.W.McTigue Butterworths,London 1965

Starck,D.: Embryologie.Ein Lehrbuch auf allgemeinbiologischer Grundlage.Stuttgart,1965

Trelstad,R.;Hay,E.;Revel,J.P.: Cell contact during early development of morphogenesis in the chick embryo. Develop.Biol.16 ,78-1o6 (1967)

Trelstad,R.: Morphogenesis of pattern in chick corneal collagen.J.Cell.Biol.39,Abstract No.136 (1968)

Wassermann,F.:The intercellular components of connective tissue.Ergebn.Anat.Entwickgesch. 35, 24o - 333 (1956)

Wise,G.,E,;Flickinger,C.J.:
Cytochemical staining of the Golgi-apparatus in Amoeba -Proteus.J.Cell Biol.46 ,62o-626 (197o)

## Lebenslauf

Ich, Heinz-Hubertus Hackelberg, wurde am 3. Juli 1943 als Sohn des Arztes Dr. Heinz Hackelberg und seiner Ehefrau Maximiliane Hackelberg, geb. Klokow, in Königsberg/Ostpreußen geboren.

Nach der Flucht meiner Mutter aus Ostpreußen lebten wir in Hoyerswerda/Oberlausitz (DDR). Dort besuchte ich von Herbst 1950 bis Herbst 1955 die Volksschule.

Von November 1955 bis April 1963 besuchte ich die Freie Waldorfschule Landschulheim Benefeld bei Walsrode, wo ich Ende März 1963 das Abitur ablegte.

Im November 1963 begann ich mit dem Medizinstudium an der Universität Frankfurt/M.
Von Mai 1965 bis April 1969 studierte ich weiter Medizin an der Freien Universität Berlin, wo ich im Sommer 1966 das Physikum ablegte.
Beendet habe ich das Medizinstudium an der Universität Hamburg, wo ich von April 1969 bis Februar 1970 studierte. Danach legte ich in Hamburg das medizinische Staatsexamen ab.